

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15148

研究課題名(和文)自然免疫系における転写因子TFEBの役割についての解析

研究課題名(英文)The role of a transcription factor TFEB in the innate immune system

研究代表者

三宅 健介(MIYAKE, Kensuke)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：リソソームのマスター制御因子である転写因子TFEBの、自然免疫系における役割について解析を進めた。予備的な結果で、TFEBの過剰発現で病原体センサーToll様受容体(Toll-like receptor, TLR)の応答が誘導されるという結果を得ていることから、その機序について解析を加えた。しかしながら別のベクターで発現させると、TLR応答が誘導されなかったために、TFEBの解析を進めることは困難であった。そこで、TFEBの制御因子であるmTORについての解析を進め、TLR3の応答にmTORC2が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study focused on the role of a transcription factor TFEB, a master regulator of lysosomes, in Toll-like receptor (TLR) responses. In preliminary studies, TFEB overexpression upregulated TLR responses. However, overexpression by another expression vector did not activate TLR responses. Further study was therefore difficult to pursue. Instead, we focused on the role of mTOR, a regulator of TFEB, in TLR responses, and found that mTORC2 play a role in TLR3 responses.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの Toll は真菌の侵入を察知し、NF- $\kappa$ B 転写因子の活性化を通して抗菌ペプチドの産生を誘導する。ヒト、マウスで機能する Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) も病原体成分に应答し、NF- $\kappa$ B 転写因子の活性化を通して、サイトカインや抗菌ペプチドの産生を誘導する。Toll から NF- $\kappa$ B までのシグナル伝達経路、誘導される应答については、ハエからヒトまで保存されている。一方、I 型インターフェロン(IFN)はハエでは保存されていないことから、転写因子 IRF を介した I 型 IFN の誘導はヒト、マウスにおいてのみ機能していると考えられる。従って、ハエにおいて保存されている自然免疫系はヒトやマウスの自然免疫系の一部という事になる。一方、線虫については、NF- $\kappa$ B 転写因子が保存されていないにもかかわらず、抗菌ペプチドが感染に際して産生される。従って、NF- $\kappa$ B 転写因子の代わりにする転写因子が存在することになる。最近、その転写因子が HLH-30(ヒト、マウスでのホモログは TFEB)である事が報告された。線虫では、細菌感染の際に HLH-30 が抗菌ペプチド産生、およびオートファジーを誘導する。一方、ヒトでは、TFEB はリソソームの機能制御に関与しており、代謝の状態に应答してオートファジーを誘導するが、自然免疫系における役割には未だ不明な点が多い。TFEB と、同じくリソソームに局在する TLR7 との関係を解析し、ヒト、マウスの自然免疫系における TFEB の役割を明らかにすることを本研究で提案した。ヒト・マウスと線虫との間で、何が保存され、何が異なるのかを明らかにする上で、貴重な情報となり、ハエとの比較ではわからなかった自然免疫系の新たな一面の解明に貢献しうる可能性がある。また、TFEB は代謝センサー mTOR と密接に関係しており、自然免疫系と代謝系との連携機構の解明にもつながる事が期待される。

## 2. 研究の目的

自然免疫系では、Toll 様受容体(TLR)をはじめとする病原体センサーが、病原体の侵入を察知し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化して、感染防御応答を誘導する。この機構はハエからヒトまで保存されているが、線虫では、TLR も NF- $\kappa$ B のどちらも保存されていない。それにもかかわらず、感染に際して抗菌ペプチド産生が誘導される。最近、リソソームの恒常性に重要な転写因子 TFEB が線虫において抗菌ペプチド誘導に関わる事が報告された。しかしながら、TFEB のヒト・マウスの自然免疫系におけ

る解析は進んでいない。本研究では、TFEB と TLR の中でもリソソームに局在する核酸特異的 TLR との関係を明らかにし、線虫からヒトまで保存された自然免疫機構の解析を進める事で、新たな自然免疫系の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

TFEB 転写因子の TLR 応答における役割を明らかにするために、TFEB 過剰発現の 3T3 線維芽細胞、J774 マクロファージの TLR 応答を調べる。すでに、TFEB の過剰発現が TLR、特に TLR7 の応答を増強させるという結果を得ているので、そのメカニズムについて、TLR の発現、局在、シグナル伝達経路について解析してゆく。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて TFEB 欠損細胞株を作成し、TLR 応答を調べる。すでに実験系は確立できているので、3T3 細胞や J774 マクロファージにおいて順次細胞を作成して解析を進める。

同様に、代謝センサー mTOR と TLR 応答の関連について解析を進める。mTORC1 阻害剤である rapamycin と mTORC1&C2 阻害剤 Torin1 を用いた実験を行い、TLR 応答を調べる。応答変化のメカニズムについて、TLR の発現やシグナル伝達経路、mTOR および TLR3 の共免疫沈降実験により解析を進める。これらの解析を通して、リソソームが自然免疫系と代謝系との接点であるというこれまでにない新規概念の構築を目指す。

## 4. 研究成果

TFEB 過剰発現細胞において TLR7 応答の増強が見られたことから、TFEB の翻訳後修飾部位について NIH3T3 細胞を用いて検証した。TFEB の S210 は代謝センサー mTOR によってリン酸化されることで TFEB の核内移行を抑制し、TFEB の活性を負に制御する。アラニン置換した S210A 変異体強制発現株では TLR7 応答の増強が見られなかった。同様に、CRISPR-Cas9 システムを用いて S210 をアラニン置換したノックイン細胞を作成し解析を行ったが、野生型と比べて TLR7 応答に変化はなかった。また、ノックイン細胞は野生型と比べて TLR7 発現量や mRNA 量に差がなかった。TFEB には他にも多くのリン酸化部位が報告または予測されている。S210 の他に 10 種類のリン酸化部位変異体を作成したが、9 種類は野生型と比べて TLR7 応答に変化はなかったが、1 つは TLR 応答が増強した。その部位を CRISPR-Cas9 システムを用いてアラニンに置換したノックイン細胞を作成したが、野生型と比べて TLR7

応答に変化はなかった。これらの結果から、TFEB 強制発現による TLR7 応答の増強は TFEB リン酸化部位による影響ではないことが示唆された。

TFEB の発現を減少させた際の TLR7 応答を検証するため、shRNA を用いて TFEB ノックダウン細胞を作成し解析を行った。TFEB ノックダウン細胞は野生型と比べて TLR7 応答に変化はなかった。また、CRISPR-Cas9 システムを用いて TFEB ノックアウト細胞の作成を幾度も試みたが、取得できなかった。これは、TFEB は細胞生存に必須な遺伝子であることが原因と考えられる。これらの結果から、TFEB 強制発現細胞の TLR7 応答の増強は、TFEB によるのではなく、ほかの原因による可能性が示唆された。我々の用いたレトロウィルス発現ベクターでは、ウィルス由来のタンパク質と導入した遺伝子からなる融合タンパク質が産生される可能性があり、そこで、ほかのベクターを用いて TFEB の強制発現細胞株を作成したところ、TLR7 の活性化は認められなかった。これらの結果から、TFEB が TLR7 の活性化に与える可能性は低くなったことから、この方向での解析を進めることを断念した。

そこで、TFEB 活性を制御する遺伝子である代謝センサー mTOR に着目した。mTOR は mTORC1 と mTORC2 という 2 種類の複合体の主要構成分子であり、TFEB は mTORC1 によって抑制される。mTOR 阻害剤(rapamycin 及び Torin1)を用いて線維芽細胞における TLR7 応答を検証した。mTORC1 阻害剤である rapamycin は、TLR7 応答によるサイトカイン産生を阻害できなかったが、mTORC1 及び C2 阻害剤である Torin1 は TLR7 応答を阻害した。現在、mTORC2 と TLR7 応答の関連について生化学的な解析を進めている。

これらの解析に加えて、核酸認識 TLR である TLR3 と mTOR の関連についても解析を進めている。TLR3 は線維芽細胞に強く発現しており、主にヘルペスウイルスなどのウィルス感染における宿主側の防御システムとして働いている。NIH3T3 細胞株に TLR3 および応答制御分子である Unc93B1 を強制発現させ、TLR3 リガンドである poly(I:C)による RANTES 産生を確認した。mTORC1 阻害剤である Rapamycin では、RANTES 産生が阻害されないのに対し、mTORC1 および mTORC2 阻害剤である Torin1 で RANTES 産生が減弱するという結果が得られた。また、当研究室では、マウス TLR3 モノクローナル抗体を作成している。しか

し、TLR3 の局在については確認されていない。抗 TLR3 抗体及び抗 Lamp1 抗体で TLR3 の局在を確認したところ、TLR3 と Lamp1 が共局在したことから、TLR3 はリソソームに局在することが示された。TLR7 や 9 の I 型 IFN 産生に AP-3 による細胞内移行が必要であることから、リガンドで刺激後の TLR3 の局在を確認したところ、TLR3 が刺激依存的に核周辺から細胞膜辺縁まで拡散していることが確認され、Torin1 は刺激依存的な TLR3 細胞内移行も阻害した。これらの結果から、我々は TLR3 の細胞内移行はサイトカイン産生に重要であり、そのどちらにも mTORC2 活性が重要である可能性を見出した。現在、TLR3 における mTORC2 活性による影響についてシグナル伝達経路などの生化学的解析を行っている。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Ryota Sato, Shin-ichiroh Saitoh, Takuma Shibata, Ryutaro Fukui, Yusuke Murakami, Akihisa Kato, Jun Arii, Yasushi Kawaguchi, Kensuke Miyake. The role of mTOR in TLR3 responses to Herpes Simplex Virus infection  
日本免疫学会

[ 図書 ] ( 計 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 ( 計 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/index.html>

平成 27 年日本免疫学会

ベストプレゼンテーション賞受賞

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

三宅 健介 (Miyake, Kensuke)

東京大学・医科学研究所・教授

60229812

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：